

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

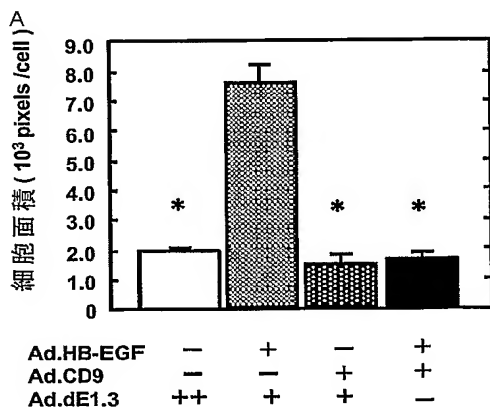
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/063302 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/00, 35/76, 45/00, A61P 9/00, 9/04, 9/06, 9/10 (74) 代理人: 西尾 章 (NISHIO, Akira); 〒5011203 岐阜県本巣市文殊 5 7 - 1 2 2 Gifu (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019774 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-432279
2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人名古屋産業科学研究所 (NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒4600008 愛知県名古屋市中区栄二丁目 1 0 番 1 9 号 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小財 健一郎 (KOSAI, Kenichiro) [JP/JP]; 〒8300023 福岡県久留米市中央町 2 9 - 1 5 ライオンズマンション中央町 1 0 0 4 号 Fukuoka (JP). 牛越 博昭 (USHIKOSHI, Hiroaki) [JP/JP]; 〒5016232 岐阜県羽島市竹鼻町狐穴 3061-6 Gifu (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG FOR PREVENTING OR TREATING HEART DISEASES COMPRISING CD9 GENE

(54) 発明の名称: CD9 遺伝子からなる心疾患を予防又は治療する医薬



A... CELL AREA

(57) Abstract: A drug for preventing or treating heart diseases which comprises an expression vector containing CD9 gene as the active ingredient. The term "heart diseases" as used above means diseases causative of heart failure, ischemic heart diseases, cardiomyopathy, hypertensive heart diseases, valvular disease, congenital heart diseases, myocarditis and diseases associated with arrhythmia, heart enlargement and/or frequent pulse. The above expression vector is a viral vector or a non-viral vector. A method of preventing or treating heart diseases which comprises expressing the CD9 gene in the heart. The prevention or the treatment is carried out by a gene therapy of transferring the CD9 gene. In the gene therapy, use is made of a drug comprising an expression vector containing the CD9 gene as the active ingredient.

(57) 要約: CD9遺伝子を含む発現ベクターを有効成分とする心疾患を予防又は治療する医薬。この発明において、心疾患は心不全をきたす疾患、虚血性心疾患、心筋症、高血圧性心疾患、弁膜症、先天性心疾患、心筋炎、不整脈、あるいは心肥大及び／又は頻脈を伴うものである。この発明において、発現ベクター

はウイルスベクター又は非ウイルスベクターである。CD9遺伝子を心臓で発現させる心疾患を予防又は治療する方法。この発明において、予防又は治療がCD9遺伝子を導入する遺伝子治療によるものである。また、遺伝子治療がCD9遺伝子を含む発現ベクターを有効成分とする医薬を用いるものである。

CD9遺伝子からなる心疾患を予防又は治療する医薬

技術分野

本発明は、心疾患を予防又は治療する医薬に関し、より詳細には、遺伝子治療
5 に用い、CD9遺伝子を心臓に導入して心疾患を予防又は治療する医薬に関する。

背景技術

心筋梗塞、心筋症、不整脈、心不全など心疾患は、日本における三大死因の一つであり、医療上大きな問題となっている。従来、心疾患の治療には利尿薬、 β
10 遮断薬、ACE阻害薬、カルシウム拮抗薬などの医薬が用いられているが、これらの医薬は心疾患を根治的に治療するものではない。

ところで、CD9は膜4回貫通型蛋白スーパーファミリー (TM4SF) の一つに分類される分子量27kDaの膜蛋白質である。CD9の生体での作用については、pre B由来の細胞の特異マーカーであること (Masellis-Smith A et al; J Immunol. 144
15 ,1607-1613, 1990)、造血系細胞、非造血系細胞を問わず、様々な細胞に発現していること (Maecker H.T et al; FASEB J. 11, 428-442, 1997、Berditchevski F ; J Cell Sci. 114, 4143-4151, 2001)、pre B細胞の凝集分化に関わること (Masellis-Smith A et al; J Immunol. 144, 1607-1613, 1990)、血小板の活性化に関わること (Jennings LK et al; J Biol Chem. 265, 3815-3822, 1990)、癌細胞を
20 はじめとする様々な細胞の接着や生存性に関わること (Hashida H, et al: Br J Cancer., 89:158-67, 2003)、受精に必須の膜蛋白であること (Miyado K et al; Science 287, 321-324, 2000)、細胞膜中で複数の蛋白質を会合させ、蛋白質間の相互作用を協調し促進する分子として作用し、細胞接着、増殖、分化、免疫、止血など創傷治癒の現象に関わること (Berditchevski F ; J Cell Sci. 114, 4143
25 -4151, 2001、Klein-Soyer C et al; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20, 360-3)の報告がある。

一方、CD9とHB-EGF（ヘパリン結合性上皮増殖因子、heparin-binding epidermal growth factor）との関係についての報告もある。例えば、HB-EGFやインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ との複合体の形成（Nakamura Y, et al : J Histochem Cytochem 49: 439-444, 2001）、HB-EGFの前駆体であるproHB-EGFのjuxtacrine factorとしての活性の調節（Higashiyama S., et al, : J. Cell Biol. 128, 929-938, 1995、Iwamoto R, Mekada E : Cytokine & Growth Factor Reviews. 11: 335-344, 2000）、HB-EGFのprocessingの過程に関わることでHB-EGFの活性の多様性を演出している可能性（Nakagawa T et al; J Biol Chem. 271, 30858-30863, 1996、Nakamura K et al; J Biol Chem. 275, 18284-18290, 2000）の報告がある。また、腎臓上皮細胞も虚血障害モデルにおいて、HB-EGFとCD9が共発現されることで生存性が改善されること（Takemura T et al; Kidney Int. 55, 71-81, 1999）、動脈硬化の過程において、HB-EGFは正常大動脈（Miyagawa J et al; J Clin Invest. 95, 404-411, 1995）や冠動脈（Nakata A et al; Circulation 94, 2778-2786, 1996）に発現されている一方、動脈硬化病変やいくつかの内膜平滑筋細胞にCD9が発現し、CD9とproHB-EGFの共発現がproHB-EGFによる平滑筋細胞の増殖を促進すること（Nishida M et al; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20, 1236-1243, 2000）からCD9は動脈硬化や組織修復の過程に繊維芽細胞の増殖や形質転換のバランスを担うHB-GFの活性を調節する重要な分子である可能性（Kirkland G et al; J Am Soc Nephrol. 9, 1464-73, 1998）の報告がある。更に、本発明者らは、心筋梗塞モデル動物におけるHB-EGFの過剰発現は、代償性の心筋肥大を促進する一方で、筋繊維芽細胞(myofibroblast)の増殖を促進し、繊維化を亢進することにより心機能低下を助長して、HB-EGFが病態の進行に重要な役割を担う中心的な因子であるとの知見を得ている。

このようにCD9の作用やCD9とHB-EGFの関係に関し多くの報告があるが、これまでにCD9が心肥大を抑制すること、あるいは頻脈を抑制することについての報告はない。

発明の開示

本発明は、心疾患を根治的に予防又は治療する医薬を提供することを課題とする。また、心疾患を根治的に予防又は治療する方法を提供することを課題とする。

- 5 本発明は、CD9遺伝子を含む発現ベクターを有効成分とする心疾患を予防又は治療する医薬を要旨とする。この発明において、心疾患が心不全をきたす疾患、虚血性心疾患、心筋症、高血圧性心疾患、弁膜症、先天性心疾患、心筋炎、不整脈、あるいは心肥大及び／又は頻脈を伴うものである。また、心肥大あるいは頻脈はHB-EGF（ヘパリン結合性上皮増殖因子）、HGF（肝細胞増殖因子）又はアン
- 10 ギオテンシン2の少なくとも1によるものである。

また、上記の発明において、発現ベクターはウイルスベクター又は非ウイルスベクターである。

- また、CD9遺伝子を心臓で発現させる心疾患を予防又は治療する方法を要旨とする。この発明において、心疾患は心不全をきたす疾患、虚血性心疾患、心筋症
- 15 、高血圧性心疾患、弁膜症、先天性心疾患、心筋炎、不整脈、あるいは心肥大及び／又は頻脈を伴うものである。

- この発明において、予防、治療はCD9遺伝子を導入する遺伝子治療によっても、あるいは内因性のCD9を発現させる発現誘導物質の投与によっても良い。また、遺伝子治療は、CD9遺伝子を含む発現ベクターを有効成分とする医薬を用いて
- 20 も良い。

- 本発明の医薬に用いるCD9遺伝子は、CD9を発現し得る遺伝子をいう。また、CD9遺伝子は、発現されるポリペプチドがCD9と実質的に同効である限りその遺伝子配列の一部の欠失、置換、挿入、あるいは他の塩基の付加された遺伝子でも良い。CD9遺伝子としては、Strausberg R.L.etal; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99,
- 25 (26)16899-16903, 2002に記載されるヒトCD9遺伝子が例示される（Gene Bankのaccession番号はAAH11988、messenger RNA番号はBC011988である）。

CD9遺伝子を含む発現ベクターは、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミドなどが挙げられる。ウイルスベクターは、例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、センダイウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、ワクシニアウイルスなどが挙げられる。非ウイルスベクターは、例えばカチオン性リポソーム、膜融合性リポソーム、カチオン性高分子などが挙げられる。リポソームは、リン脂質からなる数10～数100nmの粒径のカプセルで、その内部にCD9遺伝子を含むプラスミドを封入できる。

CD9遺伝子を含む発現ベクターの作製は、従来の遺伝子工学技術、細胞培養技術、ウイルス技術を利用して行うことができる（例えば、「Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubelら編、(1994), John Wiley & Sons, Inc.」、「Molecular Cloning (A Laboratory Manual)、Third Edition. Volume 1-3. Joseph Sambrook & David W. Russel 編集、Cold Spring Harbor Laboratory Press 社出版(Cold Spring Harbor , New York)2001」、「Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, R. Freshney編、第2版(1987), Wiley-Liss」、「Frank L. Graham著、Manipulation of adenovirus vectors, Chapter 11. p109-p128」、「E. J. Murray編、Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols (1991)」、「Chen, S-H. et al., Combination gene therapy for liver metastases of colon carcinoma in vivo. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. (1995) 92, 2477-2581.」等）。

本発明の医薬は、有効成分のCD9遺伝子を含む発現ベクターと薬学的に許容される賦形剤、担体、溶剤などの助剤とを混合し、注射剤などの種々の製剤形態で用いることができる。また、本発明の医薬の投与態様は特に限定されず、例えば注射、カテーテル、バルーンカテーテルなどにより投与できる。内因性のCD9を発現させる発現誘導物質の場合、全身静脈投与、あるいは経口投与などで投与できる。

本発明の医薬により投与されるCD9遺伝子の量は、投与を受ける者の病態、年齢、体重などを考慮して適宜増減できるが、従来の心疾患への遺伝子治療の臨床試験でウイルスベクターとしてアデノウイルスを用いた場合、ウイルス感染力価 pfu (plaque forming unit) で 2×10^{10} を用いて安全性が確認されているため、
5 同量が投与量の目安となる。また、非ウイルスベクターとしてリポソームを用いた場合、DNA量 2 mg で安全に心疾患の遺伝子治療の臨床試験が行われているため、同量が投与量の目安となる。

本発明の医薬は、遺伝子治療に用い、心不全をきたす疾患に広く適用できる。

心不全の代表的な病理は、心臓の肥大と拡張であり、心臓の肥大は各種の負荷
10 に対する形態的適応とみられるが、これには限界があり適応不全（代償不全）の状態に陥り、心筋肥大そのものが直接的に心不全やその他の心疾患の病態を悪化させることが知られている（心臓病学、石川恭三 総編集、1995年 医学書院参照）。従って、本発明の医薬が適用できる心疾患を更に例示すれば、虚血性心疾患（例えば、心筋梗塞）、心筋症（例えば、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘
15 束型心筋症）、高血圧性心疾患、弁膜症（例えば、大動脈弁、僧房弁などの閉鎖不全、あるいは狭窄）、先天性心疾患、心筋炎などが挙げられる。また、不整脈には、徐脈性不整脈と頻脈性不整脈があり、頻脈性不整脈には上室性不整脈（例えば、洞性頻脈、上室性期外収縮、心房細動、心房粗動、上室性頻拍症）、心室性不整脈（例えば、心室性期外収縮、心室頻拍、心室細動、torsade de pointes
20 ）が例示できる。また、頻脈性不整脈の発生を主な病態とする疾患として、WPW症候群、QT延長症候群、Brugada症候群、不整脈源性右室異形成症（ARVD、ARVC）が挙げられる（以上、不整脈に関し、「不整脈」（改訂版 目で見える循環器病シリーズ1、笠貫 宏 編集、2000年 メジカルビュー社）参照）。また、心肥大や頻脈を伴う心疾患に好適に用いることができる。心疾患は、HB-EGFの発
25 現による病的な心筋細胞肥大や病的な心筋細胞の頻拍（頻脈）、さらにはHGF（肝細胞増殖因子、hepatocyte growth factor）の発現やアンギオテンシン2によ

る病的心筋細胞肥大や病的心筋細胞の頻拍（頻脈）を阻止し、心筋細胞の機能を正常化させることで根治的な治療ができる。また、本発明の医薬は、投与から数時間で効果を奏するので、急性の心疾患に用いることができ、また、遺伝子治療は長期の遺伝子発現で長期の治療効果を期待できるため、高血圧症、慢性心筋梗塞など慢性的な疾患に伴う心肥大や頻脈を防止するために予防的に用いることもできる。

また、CD9を生体内で発現させることにより心疾患の予防又は治療ができ、この心疾患の予防、治療は、本発明の医薬を用いる遺伝子治療により行うこともできるが、内因性のCD9の発現を誘導する物質を投与し、生体内で内因性のCD9を発現誘導させることによっても行うことができる。

図面の簡単な説明

第1図は、CD9、HB-EGF及びHB-EGF受容体の発現を示すアガロース電気泳動の結果である。H：全心臓、CM：心筋細胞、CF：心繊維芽細胞、C1：マウス肺、C15 2：HepG2細胞、NC：ネガティブコントロール、HPRT：インターナルコントロールである。第2図は、Ad. LacZの新生マウスの心筋細胞に対する遺伝子導入効率を示すグラフ及びX-gal染色した培養心筋細胞の顕微鏡写真像である。第3図は、新生マウスの心筋細胞にAd. HB-EGF、Ad. CD9及びAd. HB-EGF+Ad. CD9を各々遺伝子導入し、免疫組織化学染色を行った心筋細胞の顕微鏡写真像である。第4図は、20、新生マウスの心筋細胞にAd. HB-EGF、Ad. CD9及びAd. HB-EGF+Ad. CD9を各々遺伝子導入後の心筋細胞面積を示すグラフである。第5図は、新生マウスの心筋細胞にAd. HB-EGF、Ad. CD9及びAd. HB-EGF+Ad. CD9を各々遺伝子導入後の心筋細胞の拍動数を示すグラフである。第6図は、Ad. CD9を遺伝子導入して発現させた新生マウスの心筋細胞にヒト組換えHB-EGF（rHB）、アンギオテンシン2（Ang2）及びヒト25 組換えHGF（rHGF）をそれぞれ作用させた場合の心筋細胞の顕微鏡写真像である。

第7図は、Ad. CD9を遺伝子導入して発現させた新生マウスの心筋細胞にヒト組

換えHB-EGF (rHB)、アンギオテンシン 2 (Ang2) 及びヒト組換えHGF (rHGF) をそれぞれ作用させた場合の心筋細胞の細胞面積を示すグラフである。グラフ中、黒塗りはCD9が遺伝子導入されたものである。第 8 図は、Ad. CD9を遺伝子導入して発現させた新生マウスの心筋細胞にヒト組換えHB-EGF (rHB)、アンギオテンシン 2 (Ang2) 及びヒト組換えHGF (rHGF) をそれぞれ作用させた場合の心筋細胞の拍動数を示すグラフである。グラフ中、黒塗りはCD9が遺伝子導入されたものである。

第 9 図は、CD9の発現の有無によるシグナル伝達におけるリン酸化の程度をウェスタンブローディングにより解析した写真像である。第 10 図は、心筋梗塞後 8 週間の成体マウスの慢性心不全モデルにおける生存曲線である。第 11 図は、心筋梗塞後 8 週間の成体マウスの慢性心不全モデルにおける心筋細胞のボーダーゾーンの顕微鏡写真像である。第 12 図は、心筋梗塞後 8 週間の成体マウスの慢性心不全モデルにおけるボーダーゾーンとリモートゾーンの心筋細胞径を示すグラフである。第 13 図は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスにおける心エコーのLVEFを示すグラフである。図中、shamは心筋梗塞を起こしていない正常マウスを、MIは心筋梗塞 (Myocardial infarction) を示す。(以下、第 14 図～第 23 図においても同様)。第 14 図は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスにおける心エコーのLVdを示すグラフである。第 15 図は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスにおけるカテーテルによる+dp/dtを示すグラフである。第 16 図は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスにおけるカテーテルによるLVSPを示すグラフである。第 17 図は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスにおけるカテーテルによるLVEDPを示すグラフである。

図 18 は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスの体重補正後の心臓重量を示すグラフである。図 19 は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスの体重補正後の肺重量である。図 20 は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスの心筋梗塞領域面積を示すグラフである。図 21 は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスの線維化面積を示すグラフである。図 22 は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスの心筋の増殖細胞を示すグラフである。図 23 は、心筋梗塞後 1 週間の成体マウスの心筋の筋線維芽細胞を示す

グラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例を挙げて説明する。なお、実施例中のプラスミド、DNA
5、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う遺伝子工学技術や細胞培養技術は、特に断らない限り上記の「Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubelら編、(1994), John Wiley & Sons, Inc.」及び「Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, R. Freshney編、第2版(1987), Wiley-Liss」に記載の方法に準じて行った。また、特に断りがない限り、アデノウイルス
10の一般的な取り扱いに関しては、上記の「Frank L. Graham著、Manipulation of adenovirus vectors, Chapter 11. p109-p128」及び「E. J. Murray編、Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols (1991)」、アデノウイルスの作製については、上記の「Chen, S-H. et al., Combination gene therapy for liver metastases of colon carcinoma in
15 vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1995) 92, 2477-2581.」に記載の方法に準じて行った。また、治療効果や現象に関しては、いずれかの群間での有意差を先ずAnova検定で解析し、続いて各二群間の個々の有意差の検定はStudent t-test (二群間非対称t検定) で解析した。また、生存率の有意差の解析には、Kaplan-Meier検定を用いて解析した。

20 実施例で用いるアデノウイルスベクターは、以下のように作製した。

プラスミドpADL.1/RSV(B. Fang et al., Gene Therapy (1994), 1, 247-254) は、上流よりヒト5型アデノウイルスの3' 側から0-455塩基部分、Rous sarcoma virus long-term repeat (RSV) promoter、マルチクローニングサイト、Bovine growth hormoneのpoly A signal配列、ヒト5型アデノウイルスの3' 側から
25 3328-5788塩基部分をpBR322プラスミドに組み込んで作製されたプラスミドでShu-Hsia Chen氏 (Mount Sinai大) より供与を受けた。pADL.1/RSVプラスミドを

制限酵素のHind IIIとNot Iで消化し、精製したものをligationに用いるベクターとした。一方、プラスミドpRc/CMV（インビトロジェン社）にヒトHB-EGFのopen reading frame全長のcDNA、サルCD9のopen reading frame全長のcDNAを含むそれぞれのプラスミドpRcHBEGF、pRcCD9は、目加田英輔氏（大阪大学）より

5 供与を受けた。pRcHBEGF、pRcCD9の両プラスミドから制限酵素のHind IIIとNot Iにより、それぞれHB-EGF cDNA、CD9 cDNAの全長を切り出し、これをアガロースゲル電気泳動して、目的のDNA断片を切り出し、精製したものをligationに用いるインサートとした。このように処理されたpADL. 1/RSVベクターとHB-EGF cDNA、CD9 cDNAインサートをそれぞれT4 DNA ligaseでligation反応を行い、pADL. 1

10 /RSV-HB-EGF、pADL. 1/RSV-CD9をそれぞれ得た。さらに、ヒト5型アデノウイルスのE1領域以外の遺伝子を含むプラスミドのpJM17（Microbix Biosystems Inc.）と共にpADL. 1/RSV-HB-EGFとpADL. 1/RSV-CD9をそれぞれ293細胞にリン酸カルシウム法で共感染した。これにより、相同組み替えを起こして正しい目的のアデノウイルスが出来たプラークが共感染10-14日後に出現した。このプラークを

15 拾い、目的のHB-EGF、あるいはCD9を発現する正しい非増殖型組み替えアデノウイルスAd. HB-EGF、Ad. CD9であることを抗HB-EGF抗体（M-18:sc-1414、SANTA CRUZ社）、抗CD9抗体（ALB6、IMMUNOTECH社）を用いた免疫染色などで確認した後、293細胞でウイルス増幅し、塩化セシウムの密度勾配遠心法により濃縮、精製して得た。

20 また、遺伝子導入に用いる大腸菌のLacZ遺伝子を発現する組み替えアデノウイルスのAd. LacZは上記と同じような方法で作製したが、Ad. LacZの作製法の詳細はProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1995) 92, 2577-2581に記載されている。また、Ad. dE1. 3は、CD9やHB-EGFが組み込まれていないためにこれらの遺伝子を何ら発現しないコントロールの組み替えアデノウイルスである。Ad. dE1. 3は、

25 CD9やHB-EGFが挿入されていないpADL. 1/RSVとpJM17を前述のように293細胞に共感染して同様の方法と過程で作製した。なお、ヒトHB-EGFは、Higashiyama, S.

, et al. Science 251, 936-939 (1991)に記載があり、Gene Bankのaccession番号はN60278である。また、CD9はサルCD9を用いたが、サルCD9はDRAP27 (diphtheria toxin receptor-associated protein) として報告されたもので (Mitamura T, et al: J Cell Biol., 118(6):1389-1399, 1992、Gene Bank の accession 番号はBAA01569である)、ヒトCD9と遺伝子配列がほとんど同じで機能も同じと考えられているものである。また、以下の実験系で行った心筋細胞の細胞面積の評価及び心筋細胞の拍動数の評価は、心肥大が心筋細胞の肥大と定義され、頻脈が心筋細胞の拍動数の増大と定義されること (世界的に最も有名且つ権威のあるテキストの「Braunwald's HEART DISEASE A textbook of cardiovascular medicine, 6th edition, 2001」参照) に基づくものである。

〔実施例1〕(ラット、マウスの全心臓及び心筋細胞におけるCD9等の発現)

全心臓と心筋細胞におけるCD9、HB-EGF及びHB-EGFの受容体群 (EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4) の内因性の発現をRT-PCR法を用いて調べた。8週令の成体SDラットと1日令の新生BALB/Cマウスからそれぞれ心筋細胞と全心臓をコラゲナーゼタイプ2 (WOR:CLS 2, Funakoshiカタログ番号45004177) で酵素的に処理し、単離した。次いで、セパゾールRNA I Super (ナカライテスク カatalog番号304-86) 1 mlを加えてホモジナイズし、クロロホルムにて水相とフェノール相に分離し、水相をイソプロパノールにて沈殿させた。遠心後、70%エタノールを用いて懸濁し、更に遠心してRNAを抽出した。1 μ gのトータルRNAをSuperScriptII逆転写酵素 (インビトロジェン社製) にて逆転写し、cDNAをPCR法にて増幅した。

HB-EGFのセンスプライマー (5 '-CCGTGATGCTGAAGCTCTTT-3'、配列番号1) とアンチセンスプライマー (5 '-CCAAGACTGTAGTGTGGTCAT-3'、配列番号2) (Yoshizumi M., et al, : J. Biol. Chem., 267, 9467-9469, 1992)、CD9のセンスプライマー (5 '-AGCAAGTGCATCAAATACC-3'、配列番号3) とアンチセンスプライマー (5 '-AATCACCTCATCCTTGTGG-3'、配列番号4) は北海道システム・サイエンス社に依頼して合成したものをを用いた。また、HB-EGFの受容体群は、Sundaresan S, et

al: Endocrinology 139:4756-4764, 1998を参照し、EGFRのセンスプライマー(5
‘-ACAAGTGTGAAGTGGTCCT-3’、配列番号5)とアンチセンスプライマー(5 ‘-TTCC
TGTAAGTTCCGCAT-3’、配列番号6)、ErbB2のセンスプライマー(5 ‘-AGCTGGTGACA
CAGCTTA-3’、配列番号7)とアンチセンスプライマー(5 ‘-TGTTGGGACTCTTGAC-
5 3’配列番号8)、ErbB3のセンスプライマー(5 ‘-GACCTAGACCTAGACTT-3’、配列番
号9)とアンチセンスプライマー(5 ‘-TCTGATGACTCTGATGC-3’、配列番号10)、
ErbB4のセンスプライマー(5 ‘-CATCTACACATCCAGAACA-3’、配列番号11)とアン
チセンスプライマー(5 ‘-AAACATCTCAGCCGTTGCA-3’、配列番号12)は北海道シ
ステム・サイエンス社に依頼して合成したものを用いた。インターナルコントロ
10 ールにヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) を用いた。

また、陽性コントロールとして上記の新生マウス肺とヒト肝癌細胞のHepG2細胞
(東北大学加齢医学研究所付属医用細胞資源センターより供与)を用いた。HB
-EGF、CD9のPCR法は、Promega Taq (Promegaカタログ番号 M1865)を使用し、
熱変性94℃、30s、アニーリング56℃、1min、伸長反応72℃、1minにて38サイク
15 ル行い、HB-EGFの受容体群、HPRTはTAKARA Ex Taq (TAKARAカタログ番号 RR001
A)を使用し、アニーリング温度を55℃として同様に行った。PCRサーマルサイク
ラーは、TAKARAのTP-400を使用した。結果は、図1に示した。

図1で示されるように、HB-EGFは成体ラット、新生マウスとも心臓で発現がみ
られ、特に培養心筋細胞でより発現が強いことから、心臓中の心筋細胞自体でHB
20 -EGFは高発現していることが認められた。また、ErbB2、ErbB4は、成体ラット、
新生マウスとも培養心筋細胞で強く発現していることが確認されたが、EGFRは成
体ラットでは発現が明らかでなく、新生マウスでは強い発現が認められた。ErbB
3は、成体ラット、新生マウスとも発現が認められなかった。一方、CD9は成体ラ
ットの全心臓では発現が認められたが、その培養心筋細胞では発現が明らかでな
25 く、新生マウスの全心臓、培養心筋細胞とも発現が認められなかった。このよう
に、HB-EGFの受容体群であるErbB2、ErbB4は心筋細胞では比較的高発現している

一方、CD9は心筋細胞にはほとんど発現していないことが明らかとなった。

〔実施例2〕（アデノウイルスベクターの遺伝子導入効率の確認）

マウスラミニン(Biomedical Technologies Inc. カタログ番号 BT-276)をコーティングした4well chamber slide(Nunc: Lab-Tek, Permanox, カタログ番号15 77437)に1日令の新生BALB/Cマウスよりコラゲナーゼ タイプ2 (WOR:CLS 2, Funakoshiカタログ番号45004177)で単離した心筋細胞 (Aoyama T, et al: Cardiovasc Res., 55:787-798, 2002) を 5×10^5 /500 μ l /wellの濃度で播き、ペニシリン (100 units/ml)及びストレプトマイシン(100 μ g/ml)、5% 非働化オーストラリア産ウシ胎児血清を含有する低グルコースDMEM培地(SIGMA カタログ番号 D60410 6)で維持し、37℃、95%空気-5%二酸化炭素の加湿培養器内で培養を行った。得られた初代培養心筋細胞へのアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率、発現の確認を行った。すなわち、初代培養心筋細胞にAd.LacZをMOI(multiplicity of infection) (多重感染度: 1MOI=1 plaque forming unit/cell) を300、100、30、10、3、0と希釈して感染させ、48時間後にX-gal染色を行った。図2に示すように15、MOI 30で96%、MOI 10においても80%以上の良好な遺伝子導入効率であった。この結果より、以下の実験ではMOI 10-30でアデノウイルスを感染させ、24時間十分に発現させた後、培地を交換し、さらに無血清培養液で洗浄し使用した。HB-EGF、アンギオテンシン2あるいはHGFを作用させる場合はさらに24時間無血清培養液にて培養した。

20 〔実施例3〕（心筋細胞の免疫組織化学染色）

上記で得た新生マウスの培養心筋細胞を4% パラホルムアルデヒドにて10分間固定し、0.05% TritonX100にて細胞膜を穿孔し、10% スキムミルク(雪印)にて60分ブロッキングした。その後、一次抗体(マウスモノクローナル抗体CD9(クローンALB6)、IMMUNOTECHカタログ番号0117) 50倍希釈(2 μ g/ml)、ヤギポリクローナル抗体HB-EGF (M-18)(SANTA CRUZ カタログ番号sc-1414) 100倍希釈を1時間25 間反応させ、HB-EGFの可視化は抗ヤギAlexa568(MOLECULAR PROBES カタログ番

号A-11057)、CD9の可視化は抗マウスAlexa488(MOLECULAR PROBES カタログ番号A-11029)で標識して行った。核染色は、Hoechst 33342(MOLECULAR PROBESカタログ番号H-3570)1000倍希釈にて5分間行なった。F-actinは、rhodamine phalloidin(MOLECULAR PROBES カタログ番号R-415)500倍希釈にて標識確認した。観察画像記録は、共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss製品番号 LSM 510)により行った。MOI 10での十分な導入効率を確認した後、Ad. HB-EGF、 Ad. CD9、 Ad. HB-EGF+Ad. CD9による心筋細胞への遺伝子導入後の発現及び局在を蛍光免疫組織染色にて確認した。結果は、図3に示した。

図3より、HB-EGFのみを単独で遺伝子導入した場合の発現パターンは、細胞内に顆粒状に染色され、CD9のみを単独で遺伝子導入した場合は細胞膜表面が染色された。しかし、HB-EGFとCD9を共発現させると、それぞれの蛋白の局在パターンが変化することが確認された。つまり、CD9は単独で遺伝子導入された場合、その導入CD9遺伝子の発現蛋白は内因性CD9の元来の発現場所である膜上に局在するが、HB-EGFとCD9を共に強発現させた場合、CD9蛋白はHB-EGF蛋白と共に細胞内へ移動することが分かった。

〔実施例4〕 (心筋細胞の細胞面積と拍動数)

上記で得た新生マウスの心筋初代培養細胞にAd. CD9、Ad. HB-EGF、Ad. CD9+Ad. HB-EGFを用いてCD9、HB-EGF、CD9+HB-EGF(それぞれMOI 10)を強発現させておき、24時間後の心筋細胞の変化を形態的、生理学的に検討した。細胞面積は、4%パラホルムアルデヒドにて心筋細胞を10分固定後、PIXELカウント(Adobe Photoshop)を用いて計測した。

図4に示すように、HB-EGFが遺伝子導入された心筋細胞の細胞面積は、コントロール(HB-EGFとCD9の遺伝子が未導入)に対し有意な増大がみられ(* $P < 0.05$ VS Control)、CD9を単独で遺伝子導入した心筋細胞の細胞面積は有意な変化がみられなかった。一方、CD9+HB-EGF遺伝子導入群の心筋細胞の細胞面積は、HB-EGFによる増大を有意に抑制していた。

次いで、上記のCD9、HB-EGF、CD9+HB-EGFが各々遺伝子導入された心筋細胞の拍動をビデオ顕微鏡観測システム(OLYMPUS顕微鏡IX 70+CCDカメラCS 900)を用いて記録した。その結果、図5に示すように、HB-EGFが遺伝子導入された心筋細胞の拍動数は、有意な増加(コントロール 70 ± 8 /minに対して 130 ± 10 /min)がみられたが、CD9+HB-EGFが遺伝子導入された心筋細胞の拍動数はコントロールとほぼ同様で(76 ± 10 /min)、CD9がHB-EGFの作用を阻害していることが示された(* $P < 0.05$ VS Control)。

新生マウスの心筋初代培養細胞にMOI 30でAd. CD9を感染させて遺伝子導入し、CD9を強発現させ、24時間後、ヒト組み換えHB-EGF(rHB-EGF、R&Dシステム カタログ番号259-HE)(濃度10ng/ml)、アンギオテンシン2(SIGMA カタログ番号 A-9525)(濃度100nM)、ヒト組み換えHGF(rHGF、R&Dシステム カタログ番号 294-HG)(濃度10ng/ml)を各々培養液に加えて心筋細胞に24時間作用させた。その後、4%パラホルムアルデヒドにて心筋細胞を固定し、免疫染色にてCD9の導入の有無を確認し、F-actin染色により筋繊維形成の程度を調べた。図6のCD9が遺伝子導入された心筋細胞(Anti-CD9の写真像参照)は、CD9免疫染色像とF-actin染色像を重合した写真像から分かるようにヒト組み換えHB-EGF、アンギオテンシン2、ヒト組み換えHGFによる心筋細胞肥大作用が抑制されていた。

また、上記のようにCD9を強発現させてヒト組み換えHB-EGF、アンギオテンシン2、ヒト組み換えHGFを各々培養液に加えた心筋細胞についてCD9を遺伝子導入していないコントロールの心筋細胞の面積を1として各群の心筋細胞の面積の比を解析した。また、心筋細胞の拍動数変化は、ヒト組み換えHB-EGF、アンギオテンシン2、ヒト組み換えHGFを加える24時間前より、Ad. CD9、あるいはAd. dE1.3(コントロール)をMOI 30にて十分に作用させた。拍動細胞の存在を確認後、無血清培養液にて3回洗浄、ヒト組み換えHB-EGF、アンギオテンシン2、ヒト組み換えHGFの各々を肥大定量時と同量加え、3時間後、培養細胞ビデオ観察システム(OLYMPUS顕微鏡 製品番号IX 70およびCCDカメラ 製品番号CS 900)を用い、2

0個以上の心筋細胞を各5分以上観察し1分間の拍動数を計測した。

図6に示すように、ヒト組み換えHB-EGF、アンギオテンシン2、ヒト組み換えHGFのいずれかを添加した場合、すべてにおいて筋繊維の形成、肥大が確認できたが、予めCD9を強発現させその発現が確認されている心筋細胞においては、
5 叙述のように肥大及び筋繊維形成が抑制されていた。また、細胞面積は、図7に示すように、統計学的に有意であった。例えば、ヒト組み換えHB-EGF単独: 2.8 ± 0.5 倍対コントロール、CD9+ヒト組み換えHB-EGF: 0.7 ± 0.1 倍対コントロールであり、アンギオテンシン2、rHGFの場合も同様にCD9は心筋細胞の肥大を抑制していた (* $P < 0.05$ VS Control、** $P < 0.001$ VS Control)。また、心筋細胞の拍動数
10 は、図8に示すように、ヒト組み換えHB-EGF、アンギオテンシン2、ヒト組み換えHGFの作用により、有意に拍動数の増加がみられ、CD9によりその作用が打ち消されることが確認された (* $p < 0.05$ VS Control、** $p < 0.001$ VS Control)。このことより、in vitroにおいてもCD9が心筋肥大作用及び心陽性変力作用を抑制することが明らかとなった。

15 〔実施例5〕（シグナル伝達におけるリン酸化の阻害）

次にCD9のメカニズムを検討するため、細胞内情報伝達のMAPK（MAPキナーゼ）のリン酸化を調べた。拍動の観察を終了した心筋細胞より、Bradford法にてプロテインアッセイキット（バイオラッド カタログ番号500-0002JA）を用いて蛋白を抽出し、SDS-PAGEに $3 \mu\text{g}$ ずつ泳動し、ウエスタンブロッティングにて確認した
20。その結果、図9に示すように、pERK(E-4) (SANTACRUZカタログ番号 sc-7383), p-p70 S6K(A-6) (SANTACRUZカタログ番号 sc-8416)、p-p38(D-8) (SANTACRUZカタログ番号 sc-7973)を用いることにより、CD9の作用でactive-ERK、active-p70 S6K及びactive-p38のリン酸化が抑制され（active-p38は軽度に抑制）、シグナル伝達を阻害していることが推測された。シグナル伝達の阻害は、ヒト組み換えHB
25 -EGFのみならず、アンギオテンシン2やヒト組み換えHGFの添加でも同様にみられ、HB-EGF、アンギオテンシン2、HGFのシグナル伝達経路に関与していることが示

唆された。なお、発色は、HRPの二次抗体にて標識し、スーパーシグナルWest Pico化学蛍光発色物(PIERCE カタログ番号 34077)にて発光させた。インターナルコントロールの蛋白質として α -tubulin(DM1A)(SIGMAカタログ番号 T-9026)を同様にウエスタンブロッティングで検出した。

5 「実施例6」 (心筋梗塞動物モデルにおける心機能の改善)

8-12週齢の成体雄マウスC57/BL6を気管切開し、麻酔器(木村医科器械 製品番号 コンパクト-15)にて全身麻酔(GOH笑気/酸素/ハロセン)した後、開胸した。冠動脈を2-0ナイロン糸にて永久的結紮し心筋梗塞動物モデルを作製した。100 μ lのPBSに溶解したAd. HB-EGF、Ad. dE1.3、Ad. HB-EGF+Ad. CD9の各ウイルス1x10¹⁰粒子を含むPBS液を心筋の心外膜側に直接散布投与し、閉胸した。4日後に血清を採血し、1週間後(心筋梗塞後1週間モデル)及び8週間後に各々屠殺して評価した。心筋梗塞1週間モデルは、心エコー(アロカ、プローブ:7.5MHZ 製品番号SSD-2000)にて左室駆出率(LVEF)、左室拡張期径(LVDd)、左室収縮期径(LVDs)、左室中隔厚(IVSt)、後壁厚(PWt)を計測した。また、右頸動脈より観血的に動脈圧モニターカテーテル(Millar Instrumentsカタログ番号SPR 407)を大動脈及び左心室内に挿入して左室収縮期圧(LVSP)、左室拡張末期圧(LVEDP)、左室最大陽性dP/dt、左室最大陰性dP/dtを測定(PowerLab system ver 4.2 ADInstruments)した。採血後に臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)を採取した。

図10に慢性期8週間までの生存曲線を示した。HB-EGFのみ遺伝子導入したマウス(HB-EGF+dE1.3)は急性期(ほぼ2週間以内)に死亡し、CD9を同時に遺伝子導入することにより(HB-EGF+CD9)生存し得た(P<0.05)。

次に組織学的な検討をした。慢性期8週間のマウスの心臓をスライスし、10%ホルマリンにて固定した。パラフィン包埋後、カットした後、HE染色した。図11に示すように、HB-EGFを遺伝子導入したマウスに比べ、CD9を同時に遺伝子導入したものは、代償性肥大が抑制されていた。また、各切片をLUZEX Fシステム(ニレコ社製)を用い、心筋細胞径をボーダーゾーン(Border:心筋梗塞部と正

常部の境界領域) とリモートゾーン (Remote: 心筋梗塞部から離れた正常の心筋部) で計測 (各サンプル各zone20個以上) した。図 1 2 に示すように、ボーダーゾーンにおいてコントロール群でもみられる代償性肥大がHB-EGF群でもみられたが、CD9を同時に遺伝子導入することにより、その肥大作用が抑制されていた(*P 5 <0.05VSControl、**p<0.001VSControl)。

また、2週間以内の急性期にHB-EGF+dE1.3群の80%が死亡した原因について検討するため作製した心筋梗塞後1週間モデルの心エコー及びカテーテルによる心機能の測定の結果は以下の通りであった。心エコーによる心機能評価では、左室駆出率(LVEF) (図 1 3 参照) において、カテーテルによる観血的血行動態評価で 10 は、左室最大陽性dP/dt及び左室収縮期圧(LVSP) (図 1 5 及び図 1 6) において、CD9の遺伝子導入群がコントロール及びHB-EGF遺伝子導入群に比し、心機能が有意に良好であった(*P<0.05VSControl)。なお、心筋梗塞後1週間の短い期間では左室の大きさに変化がないと言われているようにLVDdのCD9遺伝子導入群とコントロール並びにHB-EGF遺伝子導入群の間に差がみられなかった(図 1 4 参照)。同 15 様に左室の壁の厚さの指標となるIVSt、PWtについても心筋梗塞1週間の短い期間では有意な差がなかった(図面省略)。また、LVEDPは有意差がなかったが、CD9 遺伝子導入群では低い傾向にあった(図 1 7 参照、*P<0.05VSControl)。

これらの結果は、CD9を心臓に遺伝子導入することにより心肥大と頻脈を抑制し、心疾患の予防や改善に効果的であることを示すものであり、本発明の医薬は 20 他の心不全モデルなどにおいても応用し得るものである。

〔実施例 7〕 (心筋梗塞動物モデルにおける臓器重量の測定)

心筋梗塞作製後1週間が経過したマウスのそれぞれの群についてすべてを屠殺した。屠殺後のマウスの体重を各々測定し、心臓の重量、肺の重量をその体重で除して補正し、補正後の心臓及び肺の重量を算出した。心臓の重量増加は、心臓 25 の過剰な肥大及び拡大を示し、心不全など心機能の悪化の指標となる。また、肺の重量増加は、肺のうっ血を示し、このことは肺水腫、つまりは心不全を示す指

標となる。結果は、図 18 及び図 19 に示したように、CD9導入群は有意に臓器重量が抑制され、心不全状態になっていない(* $P < 0.05$ VS Control、** $P < 0.001$ VS Control)。

〔実施例 8〕 (心筋梗塞動物モデルにおける心筋梗塞領域面積及び線維化面積の測定)

心筋梗塞作製後 1 週間が経過したマウスのそれぞれの群についてすべてを屠殺した。屠殺後、心臓を取り出し、スライスした切片をホルマリン処理にて固定後、該切片に線維化指標のマッソン トリクローム染色を行った。心筋梗塞領域面積 (MI area) は、心筋壊死部分の左心室全体における比率を計算した。また、線維化面積は、特にマッソン トリクローム染色にて陽性部分の左心室切片全体の面積に対する比率で計算した。結果は、図 20 及び図 21 に示したように、CD9導入群は心筋梗塞領域面積 (MI area) 及び線維化面積のいずれにおいても、有意な減少を認め、治療効果が現れている (* $P < 0.05$ VS Control)。

〔実施例 9〕 (心筋梗塞動物モデルにおける心筋梗塞領域の免疫組織学的検討)

心筋梗塞作製後 1 週間が経過したマウスのそれぞれの群についてすべてを屠殺した。屠殺後、心臓を取り出し、ホルマリン処理にて固定後、パラフィン包埋し、スライス処理した。増殖細胞の指標として、Ki-67 抗原に対するモノクローナル抗体 (クローン : MIB-1、Dako Cytomation 社、カタログ番号 M7240、抗体希釈 25 倍)、筋線維芽細胞の指標として、抗平滑筋線維アクチン (α -smooth muscle actin(SMA)) に対するモノクローナル抗体による DAKO EPOS/HRP (Enhanced Polymer One-step Staining/ ペルオキシダーゼ) キット (クローン : 1A4、Dako Cytomation 社、カタログ番号 U7033) を用いて心臓のスライスを染色した。染色陽性細胞を顕微鏡にて観察を行い、高倍率 (High Power Field (HPF)) の 200 倍観察によりそれぞれのグループにつき、1 検体 10 視野の単位視野当たりの陽性細胞をカウントし平均化後、グラフ化した。結果は、図 22 及び図 23 に示したように

、CD9導入群は増殖細胞及び筋線維芽細胞のいずれにおいても、有意な減少が認められ、CD9が増殖細胞の不整かつ過剰な修復、肉芽の抑制や筋線維芽細胞の増殖を抑制することが明らかとなった (* $P < 0.05$ VS Control、** $P < 0.001$ VS Control)

。

5

産業上の利用性

本発明の医薬は、遺伝子治療に用い、CD9遺伝子を心臓に導入することにより、心疾患、特に心肥大や頻脈を伴う心疾患を根治的に予防又は治療できる。また、本発明の予防又は治療の方法は、CD9遺伝子を心臓で発現させることにより心

10 疾患を根治的に予防又は治療できる。

本発明は、発明の実質的範囲に包含される限り、上記の実施例に限定されるものではない。

15

20

25

請求の範囲

1. CD9遺伝子を含む発現ベクターを有効成分とする心疾患を予防又は治療する医薬。
- 5 2. 心疾患が心不全をきたす疾患である請求の範囲第1項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
3. 心疾患が虚血性心疾患である請求の範囲第1項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
4. 虚血性心疾患が心筋梗塞である請求の範囲第3項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
- 10 5. 心疾患が心筋症、高血圧性心疾患、弁膜症、先天性心疾患、心筋炎のいずれか1以上である請求の範囲第1項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
6. 心疾患が不整脈である請求の範囲第1項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
- 15 7. 不整脈が頻脈性不整脈である請求の範囲第6項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
8. 頻脈性不整脈が上室性不整脈及び／又は心室性不整脈である請求の範囲第7項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
9. 心疾患がWPW症候群、QT延長症候群、Brugada症候群、不整脈源性右室異形成症（ARVD、ARVC）のいずれか1以上である請求の範囲第6項～請求の範囲第8項のいずれかに記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
- 20 10. 心疾患が心肥大及び／又は頻脈を伴うものである請求の範囲第1項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。
11. 心肥大あるいは頻脈がHB-EGF（ヘパリン結合性上皮増殖因子）、HGF（肝細胞増殖因子）又はアンギオテンシン2の少なくとも1によるものである請求の範囲第10項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。

1 2. 発現ベクターがウイルスベクター又は非ウイルスベクターである請求の
範囲第1項～請求の範囲第11項のいずれかに記載の心疾患を予防又は治療する医
薬。

1 3. ウイルスベクターがアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイ
5 ルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、センダイウイ
ルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス又はワクシニアウ
イルスである請求の範囲第12項に記載の心疾患を予防又は治療する医薬。

1 4. CD9遺伝子を心臓で発現させる心疾患を予防又は治療する方法。

1 5. 心疾患が心不全をきたす疾患である請求の範囲第14項に記載の心疾患
10 を予防又は治療する方法。

1 6. 心疾患が虚血性心疾患である請求の範囲第14項に記載の心疾患を予防
又は治療する方法。

1 7. 虚血性心疾患が心筋梗塞である請求の範囲第16項に記載の心疾患を予
防又は治療する方法。

15 1 8. 心疾患が心筋症、高血圧性心疾患、弁膜症、先天性心疾患、心筋炎のい
ずれか1以上である請求の範囲第14項に記載の心疾患を予防又は治療する方法
。

1 9. 心疾患が不整脈である請求の範囲第14項に記載の心疾患を予防又は治
療する方法。

20 2 0. 不整脈が頻脈性不整脈である請求の範囲第19項に記載の心疾患を予防
又は治療する方法。

2 1. 頻脈性不整脈が上室性不整脈及び／又は心室性不整脈である請求の範囲
第20項に記載の心疾患を予防又は治療する方法。

2 2. 心疾患がWPW症候群、QT延長症候群、Brugada症候群、不整脈源性右室異
25 形成症（ARVD、ARVC）のいずれか1以上である請求の範囲第19項～請求の範囲
第21のいずれかに記載の心疾患を予防又は治療する方法。

2 3. 心疾患が心肥大及び／又は頻脈を伴うものである請求の範囲第 1 4 項に記載の心疾患を予防又は治療する方法。

2 4. 心肥大あるいは頻脈がHB-EGF（ヘパリン結合性上皮増殖因子）、HGF（肝細胞増殖因子）又はアンギオテンシン2の少なくとも 1 によるものである請求 5 の範囲第 2 3 項に記載の心疾患を予防又は治療する方法。

2 5. 予防又は治療がCD9遺伝子を導入する遺伝子治療によるものである請求の範囲第 1 4 項～請求の範囲第 2 4 項のいずれかに記載の心疾患を予防又は治療する方法。

2 6. 遺伝子治療がCD9遺伝子を含む発現ベクターを有効成分とする医薬を用 10 いるものである請求の範囲第 2 5 項に記載の心疾患を予防又は治療する方法。

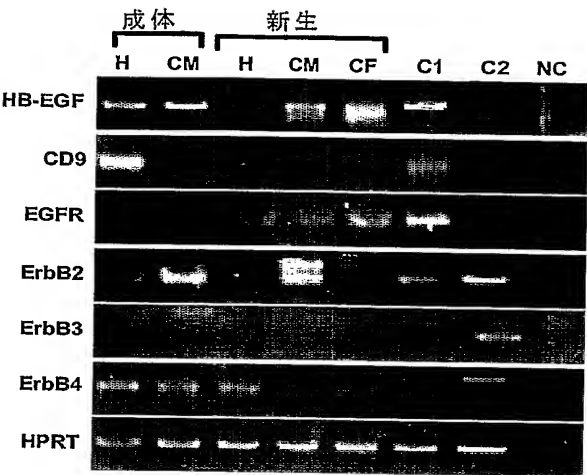
2 7. 予防又は治療が内因性のCD9を発現させる発現誘導物質の投与によるものである請求の範囲第 1 4 項～請求の範囲第 2 4 項のいずれかに記載の心疾患を予防又は治療する方法。

15

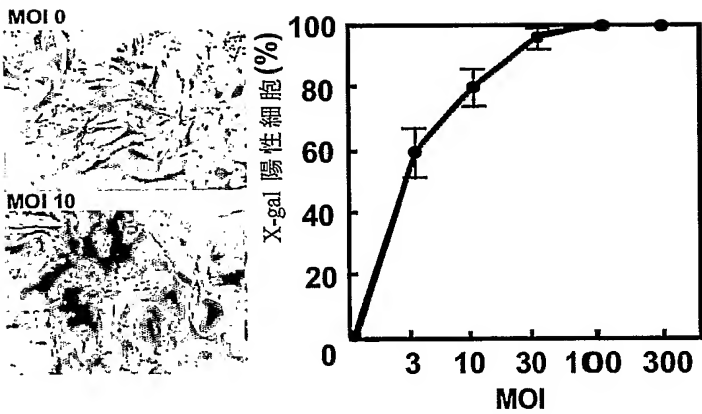
20

25

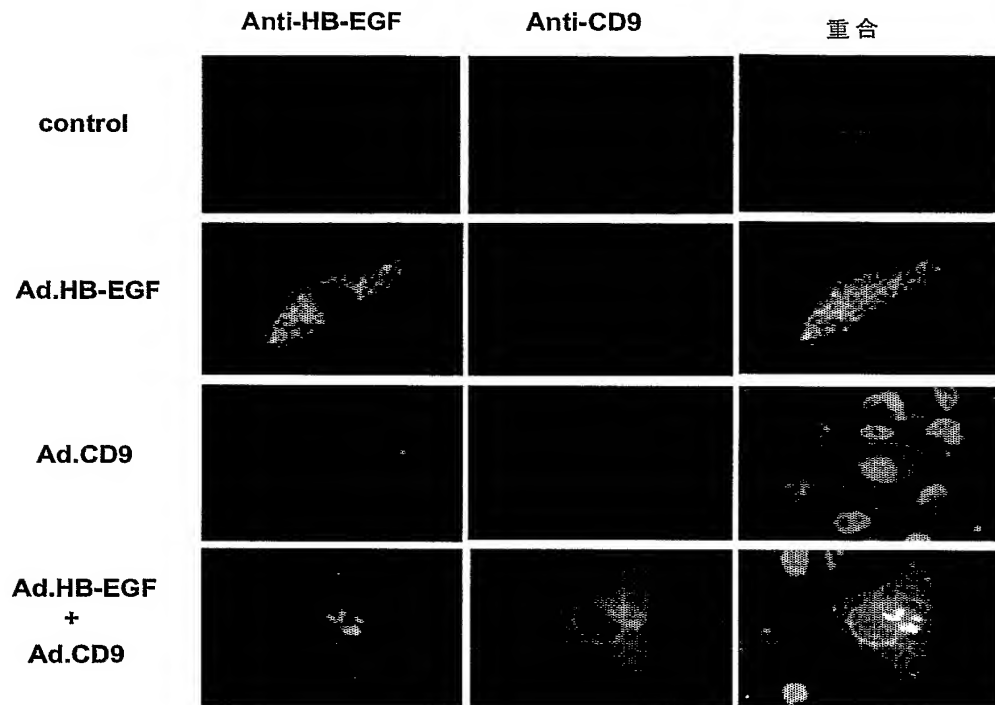
第 1 図



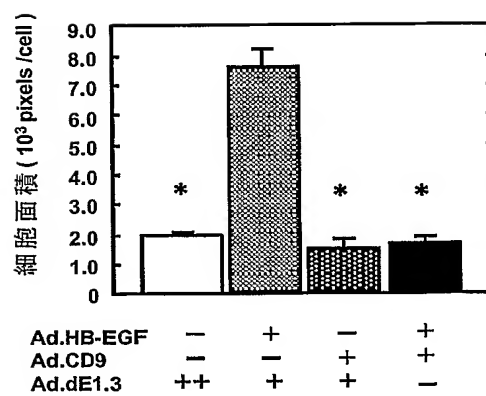
第 2 図



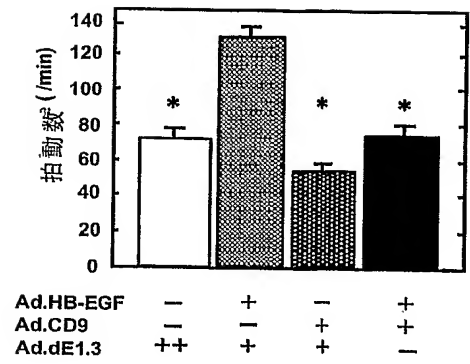
第 3 図



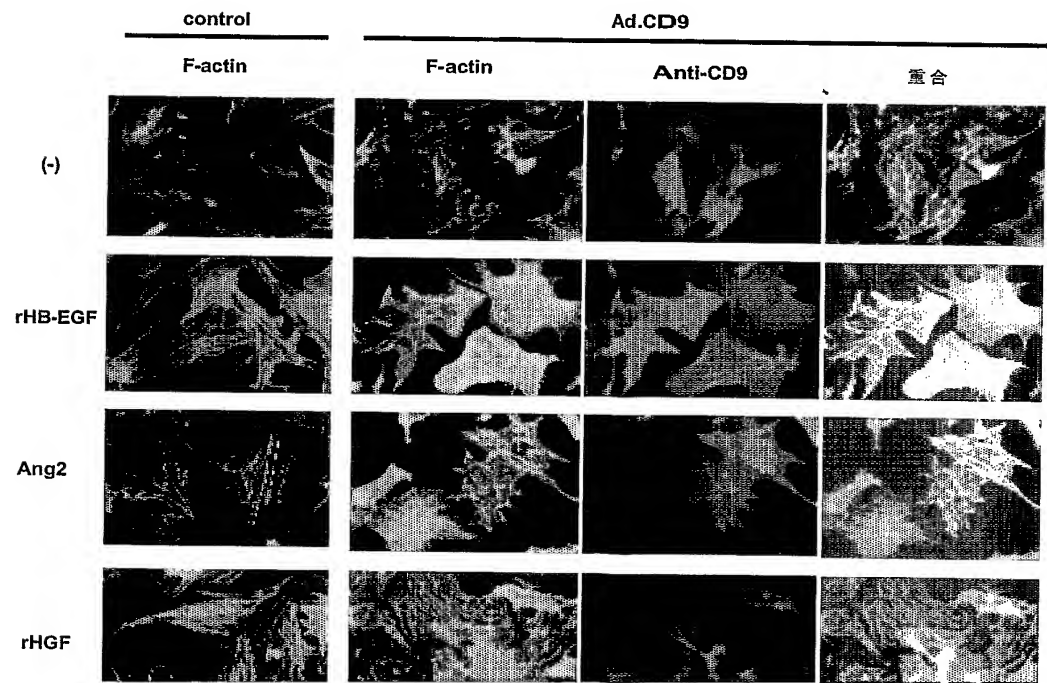
第 4 図



第 5 図

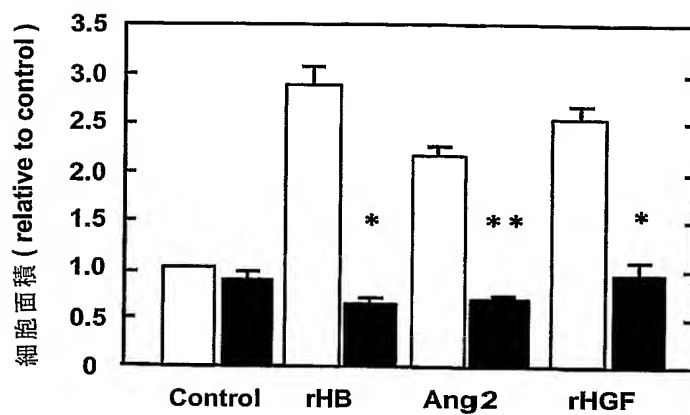


第 6 図

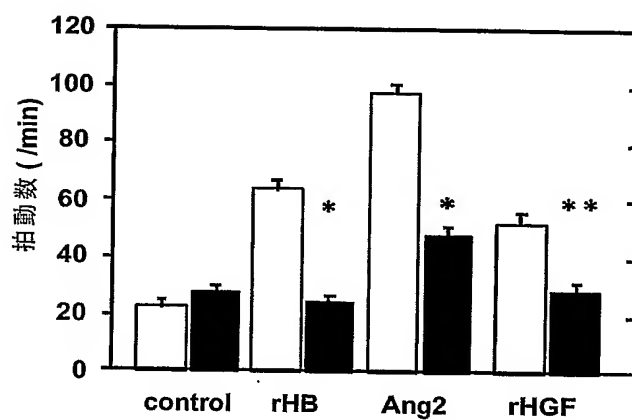


4/10

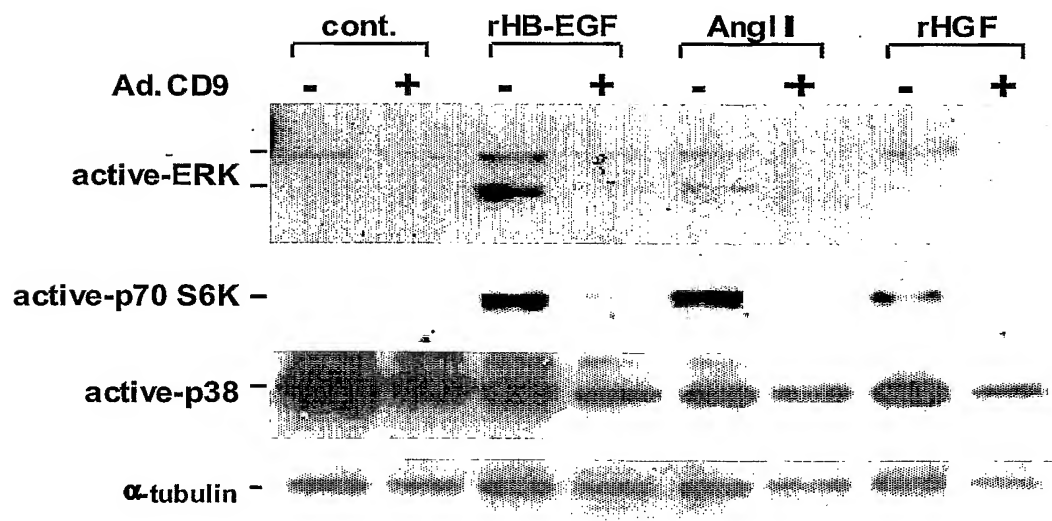
第 7 図



第 8 図

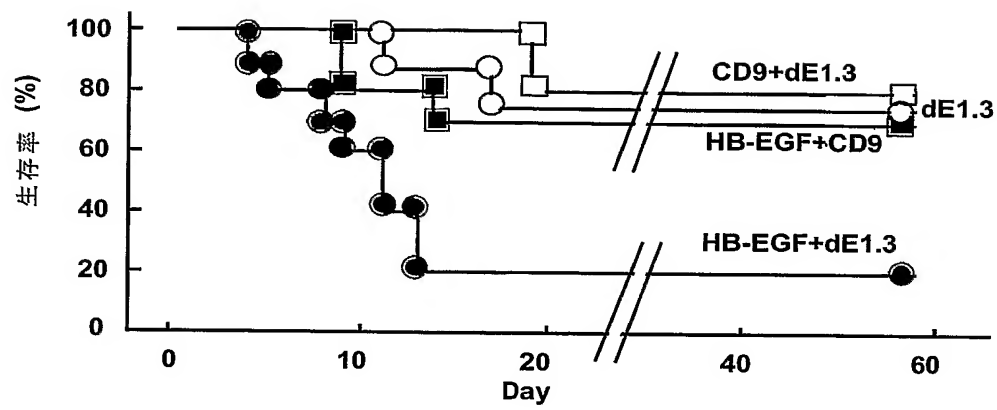


第 9 図

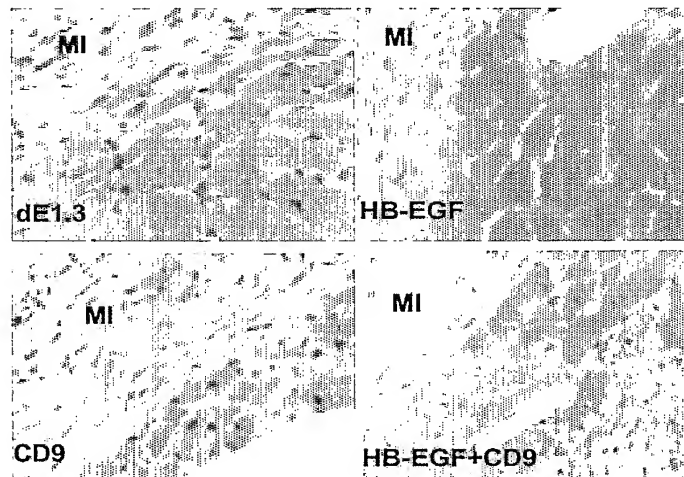


5/10

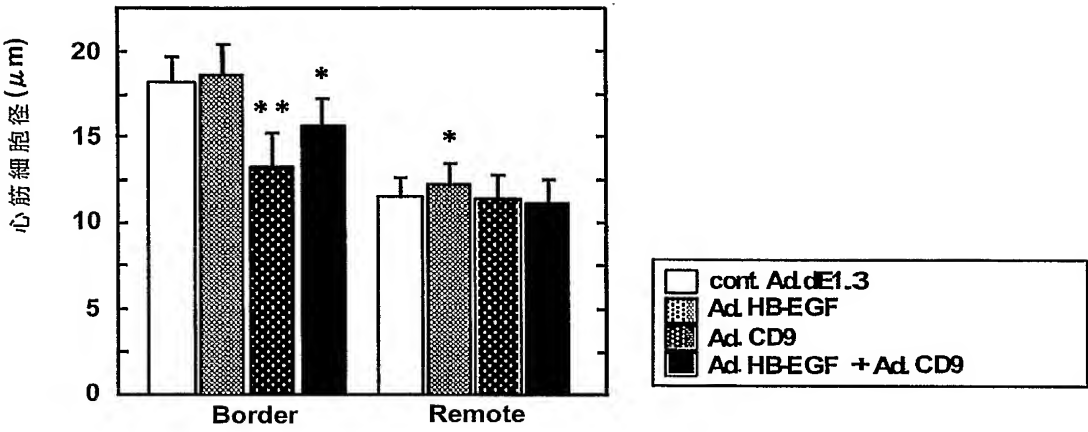
第 1 0 図



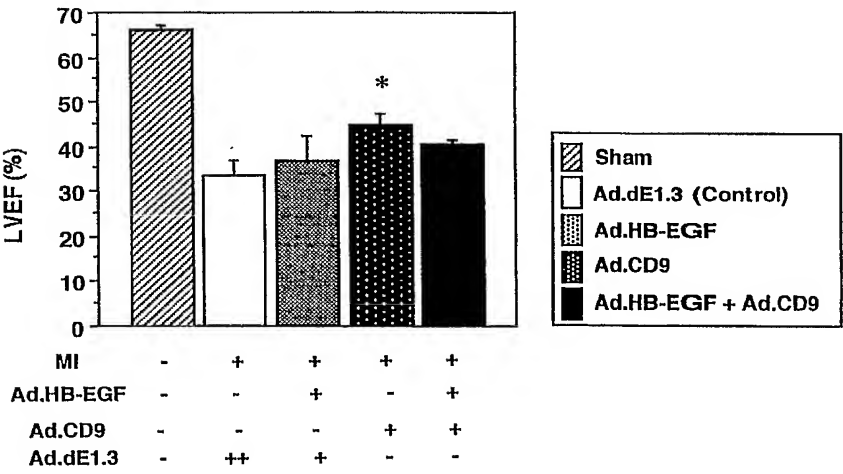
第 1 1 図



第 1 2 図

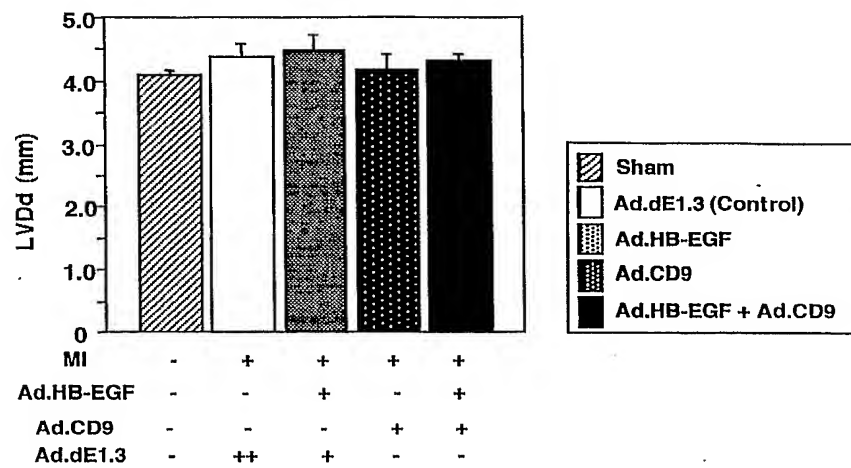


第 1 3 図

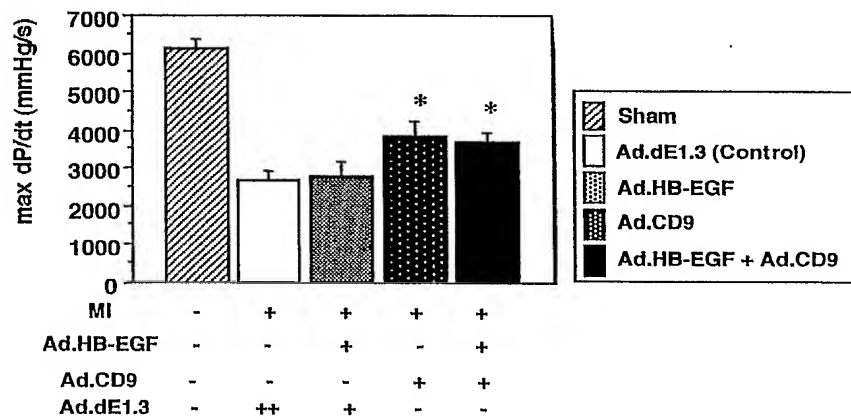


7/10

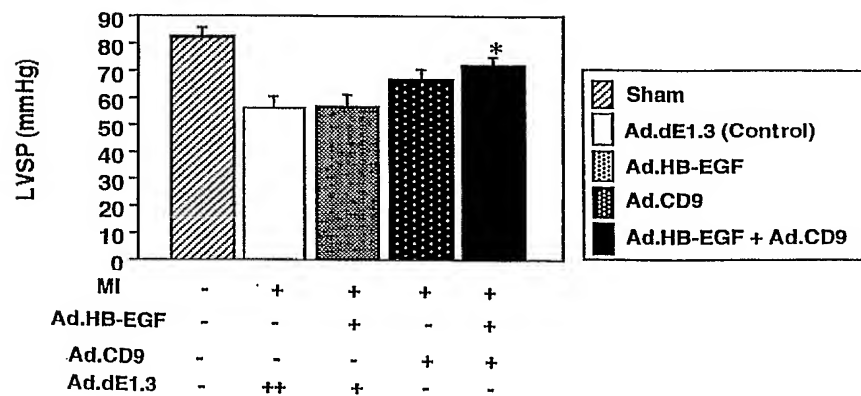
第 1 4 図



第 1 5 図

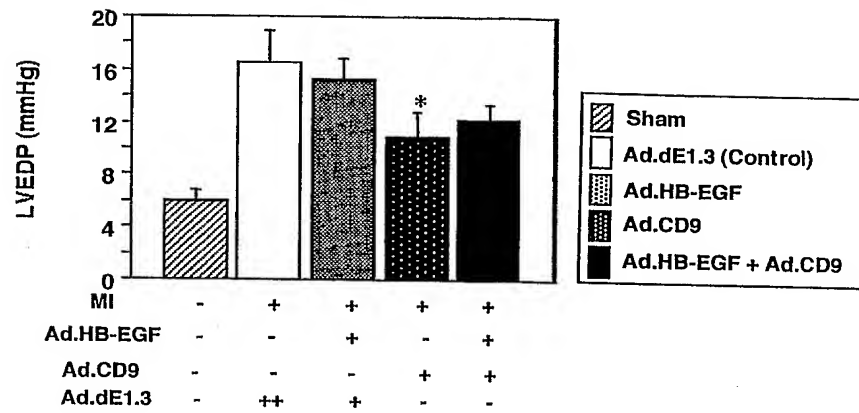


第 1 6 図

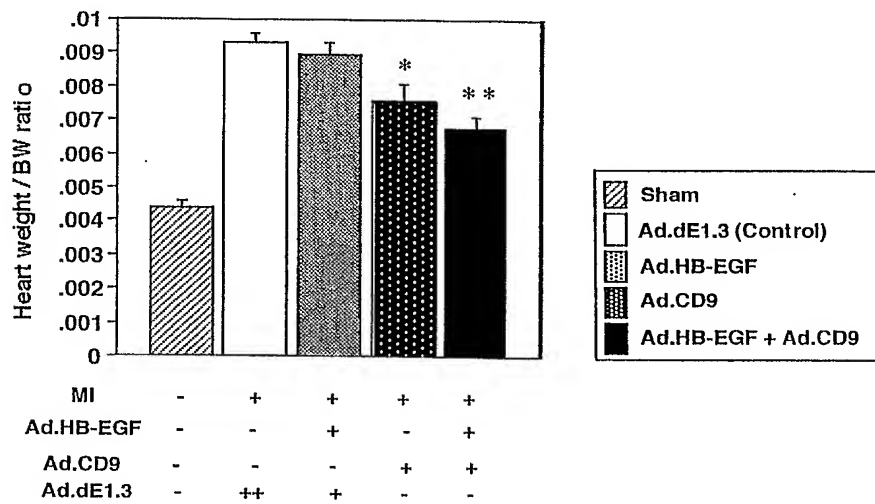


8/10

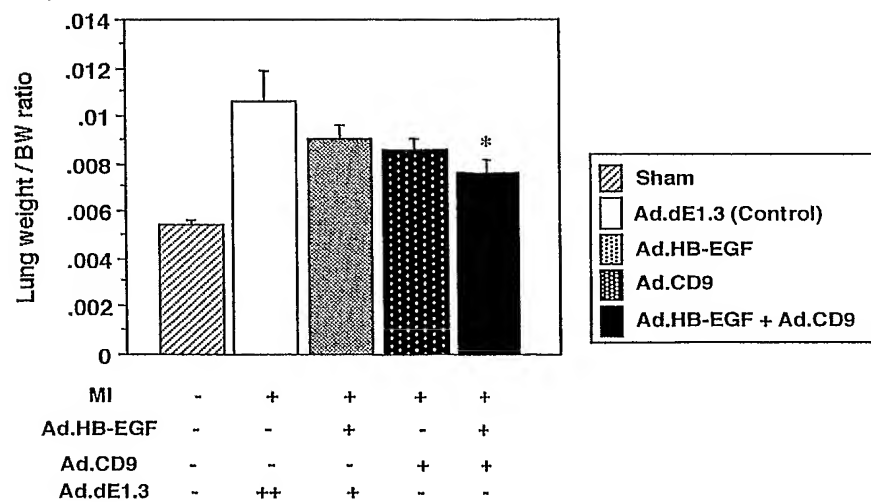
第 1 7 図



第 1 8 図

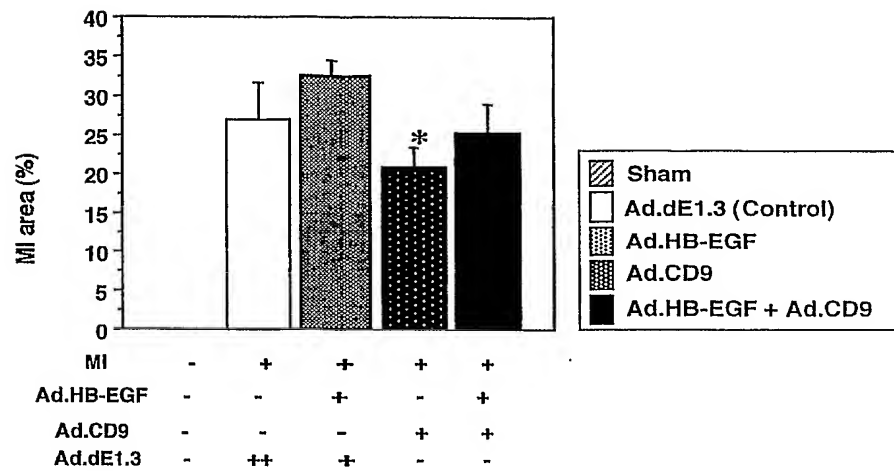


第 1 9 図

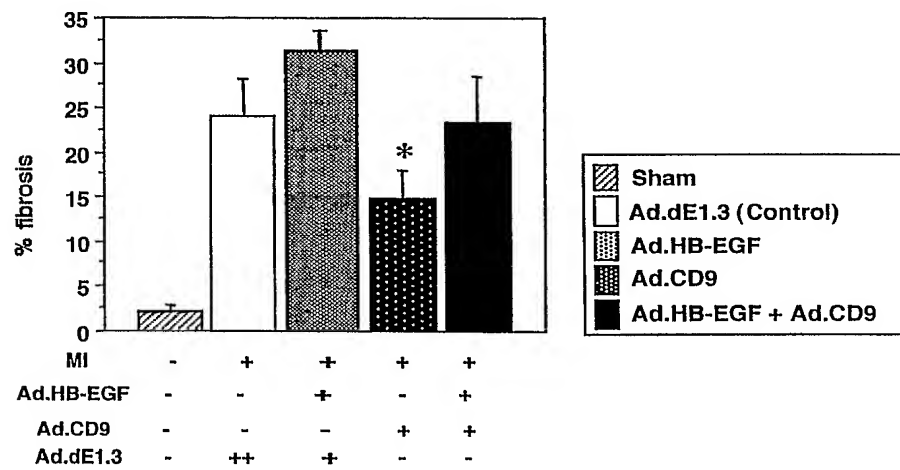


9/10

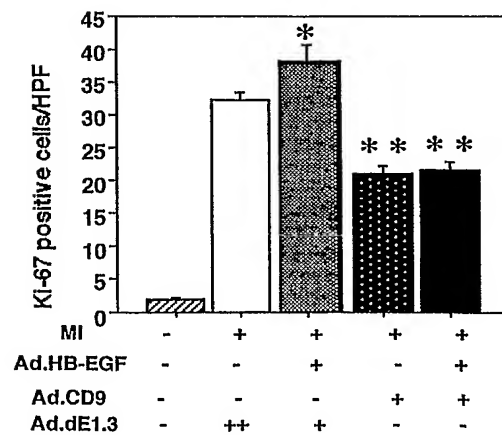
第 2 0 図



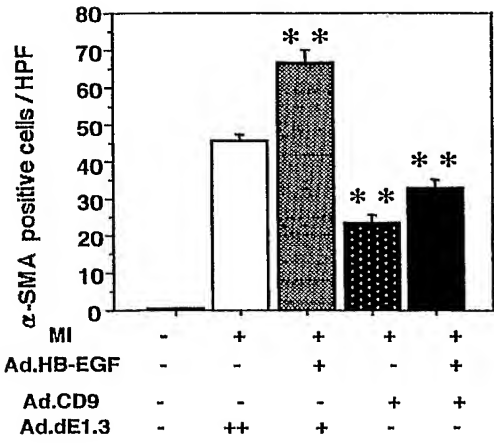
第 2 1 図



第 2 2 図



第 2 3 図



1/6
SEQUENCE LISTING

<110> NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

5 <120> PREVENTIVE OR CURATIVE MEDICINE THAT CONSISTS OF CD9
GENE FOR CARDIAC DISEASES

<130> PCT04TL2

10 <150> JP2003-432279

<151> 2003-12-26

<160> 12

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Artificial

<220>

<223> Inventor: Kosai, Kenichiro

Inventor: Ushikoshi, Hiroaki

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 1

ccgtgatgct gaagctcttt

20

5

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 2

15 ccaagactgt agtgttgtca t

21

<210> 3

<211> 19

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

25

<400> 3

agcaagtgc tcaaatacc

19

<210> 4

<211> 19

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

10

<400> 4

aatcacctca tccttgagg 19

15 <210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 5

acaactgtga agtggcct 19

25

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

5 <220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 6

ttctgtaag ttcgcat

18

10

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

15 <213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

20 <400> 7

agctggtgac acagctta

18

<210> 8

25 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

5 <400> 8

tggttgggac tctgac 17

<210> 9

10 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 9

gacctagacc tagactt 17

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 10

tctgatgact ctgatgc

17

5

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

<400> 11

15 catctacaca tccagaaca

19

<210> 12

<211> 19

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : PCR primer

25

<400> 12

aaacatctca gccgttgca

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/00, 35/76, 45/00, A61P9/00, 9/04, 9/06, 9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/00, 35/76, 45/00, A61P9/00, 9/04, 9/06, 9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JSTPLUS (JOIS),
JST7580 (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chie MORIMOTO, "HB-EGF (Heparin Ketsugosei Johi Zoshoku Inshi) to Domyaku Koka", Hormone to Rinsho, 01 December, 2003 (01.12.03), Vol.51, No.12, pages 1137 to 1143, full text	1-13
A	Makoto NISHIDA, Localization of CD9, an enhancer protein for proheparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, in human atherosclerotic plaques: possible involvement of juxtacrine growth mechanism on smooth muscle cell proliferation, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000, Vol.20, No.5, pages 1236 to 1243, full text	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 January, 2005 (25.01.05)Date of mailing of the international search report
08 February, 2005 (08.02.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ryo IWAMOTO, Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor, Cytokine & Growth Factor Reviews, 2000, Vol.11, No.4, pages 335 to 344, full text	1-13
A	Kuniaki NAKAMURA, Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity, Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol.275, No.24, pages 18284 to 18290, full text	1-13
A	Takatoshi NAKAGAWA, Amino-terminal processing of cell surface heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor up-regulates its juxtacrine but not its paracrine growth factor activity. Journal of biological chemistry, 1996, Vol.271, No.48, pages 30858 to 30863, full text	1-13
A	KIRKLAND Geoffrey, Heparin-binding EGF-like growth factor mRNA is upregulated in the peri-infarct region of the remnant kidney model: in vitro evidence suggests a regulatory role in myofibroblast transformation, Journal of the American Society of Nephrology, 1998, Vol.9, No.8, pages 1464 to 1473, full text	1-13
A	Ryo IWAMOTO, Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 18 March, 2003 (18.03.03), Vol.100, No.6, pages 3221 to 3226, full text	1-13
A	DOMINGUEZ-JIMENEZ Carmen, Involvement of $\alpha 3$ integrin/tetraspanins complexes in the angiogenic response induced by angiotensin II, FASEB Journal, 2001, Vol.15, No.8, pages 1457 to 1459, full text	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019774

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14-27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14 to 27 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/00, 35/76, 45/00, A61P9/00, 9/04, 9/06, 9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/00, 35/76, 45/00, A61P9/00, 9/04, 9/06, 9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JSTPLUS (JOIS), JST7580 (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	森本千恵, HB-EGF (へパリン結合性上皮増殖因子) と動脈硬化, ホルモンと臨床, 2003.12.01., Vol.51, No.12, p.1137-1143, 全文	1-13
A	NISHIDA Makoto, Localization of CD9, an enhancer protein for proheparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, in human atherosclerotic plaques: possible involvement of juxtacrine growth mechanism on smooth muscle cell proliferation, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000, Vol.20, No.5, p.1236-1243, 全文	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.01.2005

国際調査報告の発送日

08.02.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世

4 P

3436

電話番号 03-3581-1101 内線 3491

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	IWAMOTO Ryo, Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor, Cytokine & Growth Factor Reviews, 2000, Vol.11, No.4, p.335-344, 全文	1-13
A	NAKAMURA Kuniaki, Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity, Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol.275, No.24, p.18284-18290, 全文	1-13
A	NAKAGAWA Takatoshi, Amino-terminal processing of cell surface heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor up-regulates its juxtacrine but not its paracrine growth factor activity. , Journal of biological chemistry, 1996, Vol.271, No.48, p.30858-30863, 全文	1-13
A	KIRKLAND Geoffrey, Heparin-binding EGF-like growth factor mRNA is upregulated in the peri-infarct region of the remnant kidney model: in vitro evidence suggests a regulatory role in myofibroblast transformation, Journal of the American Society of Nephrology, 1998, Vol.9, No.8, p.1464-1473, 全文	1-13
A	IWAMOTO Ryo, Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003.03.18., Vol.100, No.6, p.3221-3226, 全文	1-13
A	DOMINGUEZ-JIMENEZ Carmen, Involvement of $\alpha 3$ integrin/tetraspanins complexes in the angiogenic response induced by angiotensin II, FASEB Journal, 2001, Vol.15, No.8, p.1457-1459, 全文	1-13

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14-27 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲14-27は、治療による人体の処置方法であり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。